

© Леонова Г.Н., 2017 г.
УДК:616.988.25-002.577.123

doi: 10.5281/zenodo.817821

Г.Н. Леонова

ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДВУХ РАЗНЫХ ПО ПАТОГЕННОСТИ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», Владивосток

Особенности биоразнообразия гетерогенной популяции штаммов вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) и их различия можно оценивать путем сравнения биологических свойств штаммов, принадлежащих к разным кластерам ВКЭ дальневосточного субтипа. *Цель исследований* – получить сравнительные данные по биологической характеристике двух штаммов вируса клещевого энцефалита разных по генетической характеристике и по патогенности для человека. *Материалы и методы.* В работе были использованы два штамма ВКЭ: Dal'negorsk (Dal') выделен в 1973 г из мозга умершего больного очаговой формой КЭ, заразившегося в Дальнегорском районе; Primorye-437 (P-437) выделен в 1999 г из крови клинически здорового человека после укуса клеща в районе б. Лазурная. *Результаты.* Показана разная степень их нейровирулентности на модели белых мышей, гемагглютинирующей активности, репликационной способности на модели клеток культуры СПЭВ. *Заключение.* Полученные результаты показали новые возможности при изучении действия профилактических и лекарственных средств, направленных против разных штаммов вируса КЭ.

Ключевые слова: штаммы вируса клещевого энцефалита, вирулентность, репликативная активность.

G.N. Leonova

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TWO FAR EASTERN TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS STRAINS OF DIFFERENT PATHOGENICITY

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

Peculiarities of biodiversity of tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains heterogeneous population and distinctions among them can be estimated by comparing biological properties of strains belonging to different clusters of the Far Eastern TBEV subtype. The purpose of *the research* is to obtain comparative data on biological characteristics of two tick-borne encephalitis virus strains varying in genetics and pathogenicity in humans. *Materials and methods.* Two TBEV strains were used in this study: Dal'negorsk (Dal') was isolated in 1973 from the brain of a dead patient infected with the focal form of TBE in the Dalnegorsky region; Primorye-437 (P-437) was isolated in 1999 from a blood sample of a clinically normal person after a tick bite at Lazurnaya Bay. *Results.* Different neurovirulence levels were observed in white mice, differences in hemagglutinating activity and replication capacity were shown in PK cells. *Conclusion.* The results obtained revealed new possibilities for studying actions of prophylactic and medicinal preparations against different TBE virus strains.

Keywords: tick-borne encephalitis virus strains, virulence, replication activity.

Введение. Несмотря на 80-летний период изучения клещевого энцефалита (КЭ) наступление ежегодного весенне-летнего периода в разных регионах Евразийского континента напоминает о том, что эта проблема до настоящего времени остается актуальной. Еще в 1937 г. первооткрыватель КЭ Л.А. Зильбер [1] понимал, что главным доказательством верификации случаев неизвестного заболевания является выделение возбудителя. За этот период в разных вирусологических лабораториях созданы большие коллекции штаммов вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), проведены многочисленные исследования по изучению этого возбудителя. Вирус КЭ относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* и является основным представителем серологической группы вирусов комплекса КЭ.

Установлено, что геном вируса КЭ содержит РНК положительной полярности длиной около 11000 оснований, которая кодирует один белок – полипротеин длиной 3414 аминокислотных остатков [2]. Полипротеин в свою очередь в процессе созревания расщепляется вирусными и клеточными протеазами с образованием 10 белков, три из которых являются структурными (М, С, Е), остальные (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) неструктурные. На основании биологических и молекулярно-генетических особенностей вируса КЭ штаммы были сгруппированы в три основные субтипы: дальневосточный (I), европейский (II) и сибирский (III) [3].

Представление о дальневосточной вирусной популяции за 80-летний период получено путем комплексного изучения биологической характеристики

и полногеномного секвенирования 46 штаммов, изолированных от больных и умерших от КЭ пациентов, заражение которых произошло на территории Приморского края. Было показано, что все штаммы ВКЭ принадлежат к одному дальневосточному субтипу и подразделяются на 3 кластера: Oshima-подобные, Sofjin-подобные и Senzhang-подобные штаммы [4, 5]. Выявлены и описаны особенности патогенного потенциала популяции штаммов дальневосточного ВКЭ [6]. Особенности биоразнообразия гетерогенной популяции штаммов и их различия можно оценить путем сравнения биологических свойств штаммов, принадлежащих к разным кластерам вируса КЭ дальневосточного субтипа.

Цель настоящих исследований – получить сравнительные данные по биологической характеристике двух штаммов вируса клещевого энцефалита разных по генетической характеристике и по патогенности для человека.

Материалы и методы

Штаммы вируса клещевого энцефалита. В работе были использованы два штамма ВКЭ: Dal'negorsk (Dal') выделен в 1973 г. из мозга умершего больного очаговой формой КЭ, заразившегося в Дальнегорском районе; Primorye-437 (P-437) выделен в 1999 г. из крови клинически здорового человека после укуса клеща в районе б. Лазурная. Оба штамма взяты в исследование после 8 пассажей при внутримозговом заражении 2-сут белых мышей. Штамм Dal' (FJ402886, GenBank) является типичным представителем Sofjin-подобных, а P-437 (JQ825162, GenBank) – Oshima-подобных штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа.

Штаммы получены из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова.

Методы исследований. Изучена нейровирулентность штаммов путем заражения мышей (массой 18–20 г.) разными дозами вируса КЭ. Использовали методику D. Hayasaka et al., [11]: мышей заражали в мозг (в/м) 10 LD₅₀ по 0,03 мл и подкожно (п/к) 1000 LD₅₀ по 0,2 мл. При другом способе мышей заражали одной дозой вируса 100 LD₅₀ в/м (0,03 мл) и п/к (0,2 мл.). На каждую опытную точку использовали по 10 мышей. Срок наблюдения составил 28 дней. Критериями оценки нейровирулентности служили процент выживших животных и средняя продолжительность их жизни (СПЖ).

Изучена гемагглютинирующая активность (ГА) этих штаммов вируса КЭ в реакции гемагглютинации (РГА) при разных значениях pH буферных растворов. С этой целью из 10% суспензии мозга больных мышей, зараженных штаммами вируса КЭ, готовили антигены на боратном буфере с последующей очисткой протаминсульфатом (Serva). РГА проводили микрометодом с использованием 0,4% взвеси эритроцитов гуся, приготовленной на фосфатном буфере pH 5,4; 6,2 и 6,8.

Изучена динамика накопления разных штаммов вируса КЭ в культуре клеток СПЭВ. Каждым штаммом заражали односуточный монослой клеток, выращенный во флаконах, заражающая доза вируса КЭ составляла 3 lg тканевой цитопатической дозы (ТЦД₅₀). Экспериментальные пробы собирали спустя 1, 3, 6, 12, 24 ч, 2, 3, 4, 5 и 6 суток. Затем проводили одновременное исследование проб культуральной жидкости по накоплению вируса, путем титрования вируса по бляшкообразующей активности (БОЕ), гемагглютинирующей активности (ГА) и по коэффициенту позитивности (К), отражающему накопление специфического антигена в ИФА. Для проведения ИФА использовали тест-системы ЗАО «Вектор-Бест» – (Новосибирск).

Коэффициент позитивности определяли по формуле:

$$K = \frac{ОП_{образца}}{ОП_{критического значения}}, \text{ при } ОП_{критическое значение} = ОП_{средняя} K' + 0,2,$$

где (ОП – оптическая плотность, K' – отрицательный контроль).

Результаты. Исходные титры штаммов вируса на модели неинбредных мышей весом 10–12 г при в/м и п/к заражении составляли для штамма Dal' – 9,8 и 9,5 lg LD₅₀/мл (соответственно) и для штамма P-437 – 7,7 и 5,5 lg LD₅₀/мл (соответственно). На культуре клеток СПЭВ накопление вируса для штамма Dal' составляло 8,0 lg ТЦД₅₀/мл, для P-437 – 5,0 lg ТЦД₅₀/мл.

На модели взрослых белых мышей изучена вирулентность штаммов в двух вариациях: путем в/м и п/к способов заражения разными дозами (10 и 1000 LD₅₀), или одной дозой (100 LD₅₀) вируса (табл. 1). При в/м заражении мышей оба штамма показали высокую степень вирулентности. Различия в вирулентности получены при п/к введении вируса. Наибольшую активность проявил штамм Dal', средняя продолжительность жизни (СПЖ) составила: 7,1 дня при введении 1000 LD₅₀ и 14,7 дней – при 100 LD₅₀. Менее активным оказался штамм P-437 (СПЖ – 25,1 и 22,1 дней, соответственно).

Для сравнительного изучения гемагглютинирующих свойств этих штаммов вируса КЭ из мозга заболевших мышей были приготовлены очищенные антигены. На рис. 1 видно, что при трех значениях pH (5,4; 6,2; 6,8) ГА штаммов, вызвавших разные формы инфекции, различалась. Наибольшей активностью обладал штамм Dal', вызвавший очаговую форму инфекции. Средние показатели ГА для штамма P-437, вызвавшего инаппарантную форму КЭ, были ниже (1:84; 1:79; 1:79) по сравнению с показателями штамма Dal'.

Различия репликативной активности этих штаммов зараженными клетками СПЭВ при одинаковой заражающей дозе (3 lg ТЦД₅₀/мл) показаны с помощью сравнительного изучения скорости накопления

Таблица 1

Показатели выживаемости и средней продолжительности жизни мышей, зараженных штаммами Dal'negorsk и Primorye-437 вируса КЭ

Штамм	Выживаемость (%)				Средняя продолжительность жизни мышей (дней)			
	в/м 10 LD ₅₀	п/к 1000 LD ₅₀	в/м 100 LD ₅₀	п/к 100 LD ₅₀	в/м 10 LD ₅₀	п/к 1000 LD ₅₀	в/м 100 LD ₅₀	п/к 100 LD ₅₀
Dal'negorsk	0	0	0	30	6,4	7,1	5,0	14,7
Primorye-437	70	60	0	60	22,4	25,1	8,0	22,1

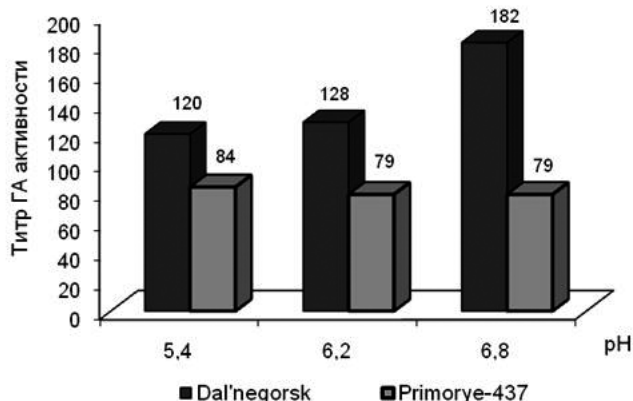


Рис. 1. Показатели гемагглютинирующей активности штаммов Dal'negorsk и Primorye-437 вируса КЭ при трех значениях pH (5,4; 6,2; 6,8)

разных штаммов вируса КЭ в культуральной жидкости по гемагглютинирующей, бляшкообразующей активности и по показателям К антигена в ИФА.

Как видно в табл. 2, штаммы отличались по накоплению ГА в культуральной жидкости. Для штамма Primorye-437, отмечено менее активное и замедленное накопление ГА. Максимальные показатели ГА в культуральной жидкости клеток СПЭВ достигали только на 6 и 7 день после заражения.

Для выявления антигена вируса КЭ пробы культуральной жидкости этого опыта были исследованы в ИФА. Из данных табл. 2 видно, что штамм Р-437 в надосадочной жидкости зараженных клеток СПЭВ, начиная с 3 час после заражения, показывал положительные уровни коэффициента позитивности (К), свидетельствующие о присутствии здесь специфического антигена. Антиген штамма Dal' до 2 сут не определяли. И только спустя 2 сут. в культуральной жидкости клеток СПЭВ, зараженных штаммом Dal', определяли специфический антиген (К=9,3). Накопление антигена штамма Р-437 происходило замедленно (К=2,9).

Таблица 2

Показатели инфицированности клеточной культуры СПЭВ, зараженной штаммами Dal'negorsk и Primorye-437

Штамм	Заражающий титр вируса	Показатели инфицированности клеток	Время наблюдения после инфицирования клеток СПЭВ (ч – час; с – сутки)									
			3 ч	6 ч	12 ч	1 с	2 с	3 с	4 с	5 с	6 с	7 с
Dal'negorsk	2,5 lg TCID ₅₀ /мл	ГА активность	0	0	0	0	0	0	2	8	32	64
		ИФА (К- коэф.)	0	0	0	0	9,3	9,5	н.и	н.и	н.и	н.и
Primorye-437	3,0 lg TCID ₅₀ /мл	ГА активность	0	0	0	0	0	0	0	8	16	16
		ИФА (К-коэф.)	1,2	1,6	1,5	0,9	2,9	3,1	н.и	н.и	н.и	н.и

Эти результаты совпадали с показателями по выявлению вируса в надосадочной жидкости зараженных клеток СПЭВ с помощью бляшкообразующего теста (рис. 2). На первый взгляд можно подумать о присутствии антигена в пробах штамма Р-437 в виде дефектных вирусных частиц, не способных быстро, как и штамм Dal', проникать в клетку. Однако по результатам бляшкообразующего теста видно, что в культуральной жидкости проб с инаппарантным штаммом Р-437 находятся жизнеспособные вирусные частицы, не проникшие в клетку. Видимо, рецепторная связь вирусных частиц с клетками была не прочной, на протяжении опыта они могли легко возвращаться в культуральную среду, где мы выявляли антиген в ИФА, а также свободноплавающие вирусные частицы с помощью бляшкообразующего теста. Такой феномен мы не наблюдали у штамма Dal' – в культуральной жидкости до 48 ч инкубации ни вируса, ни антигена выявлено не было (рис. 2, табл. 2).

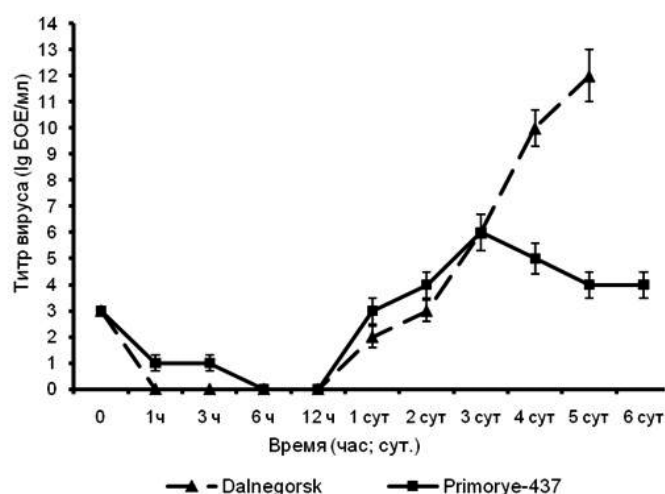


Рис. 2. Показатели накопления штаммов Dal'negorsk и Primorye-437 вируса клещевого энцефалита в культуральной жидкости зараженных клеток СПЭВ по данным бляшкообразующего теста в разные сроки наблюдения от 1 ч до 6 сут.

Обсуждение. Целенаправленное изучение двух штаммов Dal' (Sofjin-подобного), и Р-437 (Oshima-подобного) вируса КЭ дальневосточного субтипа показало значительные различия их биологической характеристики на разных моделях. Получены отличия в репликации штаммов вируса КЭ не только *in vivo* [6], но и *in vitro* с помощью сравнительного изучения скорости накопления штаммов вируса КЭ в культуральной жидкости зараженных клеток СПЭВ по гематтлутинирующей активности и по показателям К антигена в ИФА.

Таким образом, на примере изученных нами штаммов установлены различия: штамм Dal', вызвавший очаговую форму КЭ с летальным исходом, проявил выраженную рецепторную активность в отношении клеток СПЭВ. В то же время у штамма Р-437, который для человека был не патогенен, не все вирусные частицы были способны активно в полном объеме связываться с рецепторами клеток, быстро проникать и размножаться в них. По мнению О.В.Сергеева [7] далеко не все вирусные частицы гетерогенной вирусной популяции способны адекватно связываться с рецепторами разных клеток и не все прикрепленные к клетке вирусные частицы способны проникать в клетку и размножаться. Полученные результаты показали нам новые возможности при изучении действия профилактических и лекарственных средств, направленных против разных штаммов вируса КЭ. Такие результаты получены нами в отношении действия специфического иммуноглобулина против этих штаммов ВКЭ [8].

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа поддержана научным проектом (0545-2014-0011) ФАНО.

Сведения об авторе

Леонова Галина Николаевна – главный научный сотрудник лаборатории флавивирусных инфекций, доктор медицинских наук, профессор НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова; Владивосток, ул. Сельская 1, 690087; e-mail: galinaleon41@gmail.com

ЛИТЕРАТУРА

1. Зильбер Л.А. Весенний (весенне-летний) эпидемический клещевой энцефалит. *Арх. биол. наук.* 1939; 56(2): 9–37.
2. Pletnev AG, Yamshchikov VF, Blinov VM Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus. *Virology.* 1990; 174(1): 250–263
3. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier, San Diego.* 2012; 1003–1020.
4. Belikov SI, Kondratov IG, Potapova UV, Leonova GN The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS One.* 9(4):e94946. doi:10.1371/journal.pone.0094946.
5. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G. Characteristics of far eastern strains of tick-borne encephalitis virus. *Arch Virol* 2017; doi 10.1007/s00705-017-3309-1.
6. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G., Takashima I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of TBEV strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. *Virology.* 2013; 443: 89–98.
7. Сергеев О.В. Рецепторные взаимодействия вируса и клетки как начальный этап инфицирования. // *Вопр. вирусол.* 2011; 4: 4–8.
8. Леонова Г.Н. Влияние специфических антител на процесс элиминации вируса клещевого энцефалита // *Здоровье. Медицинская экология. Наука.* 2017; 1: 43–47. doi: 10.5281/zenodo.345610

© Лобова В.А., Леонова Г.Н., 2017 г.
УДК:616.988.25-002.577.123

doi: 10.5281/zenodo.817819

В.А. Лубова, Г.Н. Леонова

К ВОПРОСАМ ЭПИДЕМИОЛОГИИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА НА ЮГЕ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», Владивосток, Россия

Клещевой энцефалит на сегодняшний день остается актуальной проблемой для Приморского края.

Цель работы: проанализировать данные выявления антигена вируса КЭ в иммуноферментном анализе (ИФА) при обследовании иксодовых клещей, присосавшихся к людям на южных территориях Приморского края за период 2014–2016 гг. **Материалы и методы:** всего было обследовано 3323 экземпляра клещей, присосавшихся к людям в природных очагах юга и юго-востока Приморья в период 2014–2016 гг. Обследование клещей проводили методом иммуноферментного анализа. **Результаты и обсуждение:** заболеваемость КЭ на территории Приморского края в 2014, 2015, 2016 гг. была крайне низкой от 0,86% до 1,37% на 100 тыс.